

Anti-wrinkle Compounds Isolated from the Seeds of *Arctium lappa* L.Ju-Young Hwang¹, Tae-Soon Park¹, Dong-Hee Kim¹, Eun-Young Hwang¹, Jung-Noh Lee², Ji young Lee², Ghang-Tai Lee², Kunkook Lee² and Jun-Ho Son^{1*}¹Korea Promotion Institute for Traditional Medicine Industry, Gyeongsan, Gyeongbuk 712-260, Korea²Coreana Cosmetics Co. Ltd Songpa R&D Center, Cheonan 330-833, Korea

Received June 27, 2012 / Revised August 20, 2012 / Accepted August 22, 2012

This study was carried out to discover the skin wrinkle reducing components in the seeds of *Arctium lappa*. The isolation of a methylene chloride-soluble fraction of 70% ethanol extract from the seeds of *Arctium lappa* using a procollagen type-1 synthesis and MMP-1 activity resulted in the isolation and identification of four lignin compounds: arctiin, arctigenin, matairesinol, and diartigenin. All structures were confirmed via NMR and MS spectroscopic data. To determine cell viability and procollagen type-1 synthesis, human dermal fibroblasts were treated with 10-100 μ M. As a result, none of the four compounds showed cytotoxicity up to 50 μ M. We also investigated their procollagen type-1 synthesis and MMP-1 inhibition activity and found that arctiin had the highest activity in terms of both procollagen synthesis and MMP-1 inhibition among all four compounds. Putting all the data together, we suggest that arctiin be used in cosmetics as an anti-wrinkle material.

Key words : *Arctium lappa*, arctiin, procollagen type-1 synthesis, matrix metalloproteinase (MMP) inhibition activity.

서 론

피부의 노화는 시간의 흐름에 따라 호르몬 분비의 감소와 세포들의 기능과 활성이 저하되어 생체 구성 단백질들의 생합성이 감소하여 생기는 내재적 노화 과정과 공기, 약물, 자외선에 의해 피부가 얇아지며, 주름이 증가되어 탄력이 감소하는 외재적 요인에 의한 노화과정으로 나누어진다[4,11]. 특히 자외선(ultraviolet, UV)은 각종 피부 트러블을 유발시키고 기미, 주근깨, 피부 색소 침착 등의 노화 현상을 촉진[29] 및 피부암 등 여러 가지 피부 질환의 원인이 되기도 하며[13], 피부조직의 교원질 중 탄력섬유인 collagen과 elastin을 분해하여 피부 탄력이 떨어지고 주름을 유발시켜 표면을 거칠게 한다[9].

Collagen, elastin, proteoglycan, fibronectin 및 laminin 등 진피의 세포의 기질은 대부분 섬유아세포(fibroblast)에서 만들어지며 세포 밖으로 분비된 후 3중 나선구조형태인 collagen이 만들어진다[2]. collagen은 피부에 강도와 장력을 부여함으로써, 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 collagen의 감소는 피부의 노화와 매우 밀접한 관계를 가지고 있다[12].

생체 내에서 collagen과 같은 세포의 기질의 합성과 분해는 적절하게 조절되거나 노화가 진행되면서 그 합성이 감소하고, 피부가 자외선에 노출되면 다양한 기질 단백질 분해 효소인 matrix metalloproteinase (MMP)의 발현이 촉진된다. MMP는

extracellular matrix (ECM, 세포외 기질)과 basement membrane (BM, 기저막)의 분해에 관여하는 여러 효소의 family로 구조와 기능적 특성에 따라 interstitial collagenase, stromelysin, gelatinase, membrane-type MMP (MT-MMP) 등 네 가지의 subfamily로 나누어진다. MMP는 활성 중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen) 형태로 분비된다[7,18]. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단, 활성화되며 활성화된 MMP는 2 α -macroglobulin이나 tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)와 같은 저해제에 의해 활성이 조절되고 피부의 keratinocyte, fibroblast를 포함한 대다수의 많은 세포들이 MMP를 분비한다[27]. Fisher 등[6]은 UV 조사에도 피부내의 MMP 활성이 증가되며, 증가된 MMP들이 진피층의 collagen을 붕괴시킴으로써, 피부 광노화에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 보고한 바 있다.

우방자(*Arctium lappa* seed)는 오실, 대력자, 서정자, 우자 등으로도 불리는 국화과에 속하는 우영의 성숙한 과실로 아시아 및 전 세계에 널리 분포되어 있다[1,5,21]. 우방자에 대한 연구로는 돌연변이 유발 감소 효과[22], acetaminophen에 의해 유발되는 간 손상에 대한 보호 기능[20], 항 알러지 작용에 관한 연구[24], 우방자 추출물의 compound 48/80 유도 비만 세포 활성화와 혈관 투과성 억제 효과[17]에 대한 연구가 되어 있다. 하지만 우방자를 활용한 주름개선물질과 피부노화에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 논문에서는 우방자 추출물로부터 주름개선에 활성을 갖는 4종의 lignans계 물질을 분리, 동정 및 이 화합물의 주름개선 활성을 확인한 결과를 보고하고자 한다.

***Corresponding author**

Tel : +82-53-810-0320, Fax : +82-53-801-9896

E-mail : bio115@hanmail.net

재료 및 방법

재료

본 실험에 시료로 사용한 우방자는 경동시장에서 구입하여 사용하였으며, 표본시료는 (주)코리어나화학제품 신소재 개발팀에 보관되어 있다. 그 외 collagen 생합성 측정에 사용된 시약은 procollagen type I C-peptide EIA kit (Takara bio, Japan)을 구입하여 사용하였고 MMP-1 활성을 측정하기 위하여 MMP-1 kit (Amersham Bioscience, NJ, USA), tumor necrosis factor- α (TNF- α)는 Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용한 human fibroblast세포로 HS68은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였다. 세포 배양에 사용한 시약은 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), 0.25% trypsin, 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/ streptomycin (100 U/ml)은 Hyclone (Logan, UT, USA)에서 구입하여 배양하였다. 세포 생존률 측정에 사용된 시약은 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium-bro-

mide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출물의 제조 및 분획

우방자 1 kg를 분쇄기를 이용하여 잘게 파쇄한 후 70% 에탄올 7 L에 상온에서 5일간 2회 반복 추출한 뒤, 감압농축기를 이용하여 에탄올을 제거하여 농축액 약 1kg을 얻었다. 이후 용매추출법(solvent extraction method)을 이용하여 극성도가 낮은 n-hexane으로 추출한 후, 다시 methylene chloride (MC)와 ethyl acetate (EtOAc)용매로 순차적으로 추출하였다. 각 용매 추출 분획을 감압 농축하여 n-hexane 가용분획(약 62.3 g), MC 분획(약 101.4 g), EtOAc분획(약13.6 g), H₂O가용분(130.1 g)을 각각 얻었다. 각 분획물에 대해 피부노화와 관련이 있는 procollagen type-1 synthesis, MMP-1 activity assay를 시행한 결과 Table 1과 같았으며, 강한 활성을 보이는 MC 분획물과 EtOAc분획물에 대해 activity-guided isolation을 수행하여 활성물질의 분리 정제를 실시하였다(Fig. 1).

Table 1. Anti-wrinkle effects of the ethanolic extracts of *Arctium lappa* L. seed and its n-hex layer, MC layer, EtOAc layer and water layer (100 μ g/ml)

	Collagen type-1 synthesis (%) ^a	MMP-1 inhibition (%)
70% EtOH ext.	111.2 \pm 2.1	85.1 \pm 1.1
n-hexane layer	105.3 \pm 1.4	83.2 \pm 0.4
MC layer	121.8 \pm 0.6	70.1 \pm 1.2
EtOAc layer	108.2 \pm 1.1	79.7 \pm 1.8
Water layer	101.1 \pm 0.9	89.1 \pm 2.1
Adenosine ^b	110.1 \pm 2.8	80.1 \pm 0.9

^a Data represent the mean \pm threes replications

^b Adenosine was used as a positive control

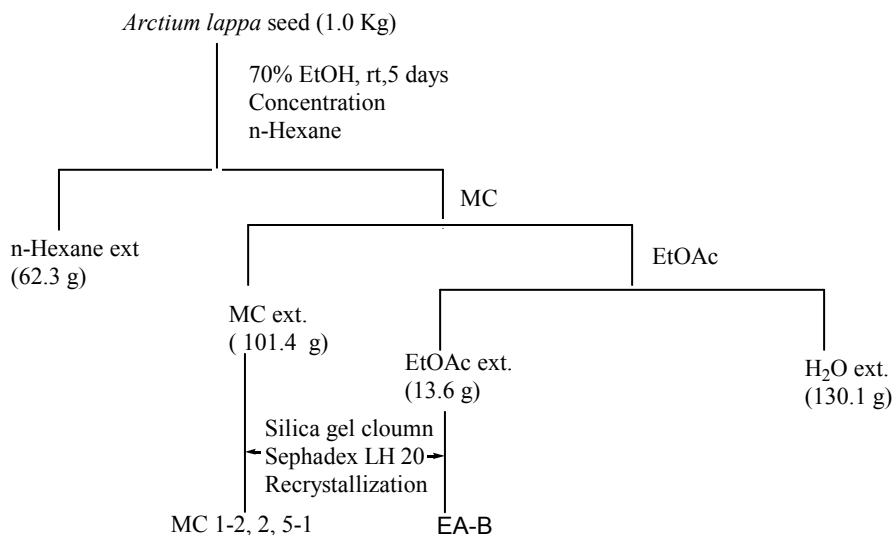


Fig. 1. The isolation flow chart from *Arctium lappa* L. seed extract.

활성물질 분리

Methylene chloride (MC) 가용분획물을 silica gel chromatography (230 mesh, Merck)로 MC:MeOH (30:1→5:1)의 조건으로 이동상을 흘려주면서 TLC (Kiesel gel 60 F254) plate (MC:MeOH (10:1))에서 Rf 값이 0.71, 0.65, 0.23 값인 물질을 분리하였다. 이때 사용한 UV lamp 파장은 254 nm 이었다.

각각의 물질을 sephadex LH-20 resin에서 이동상으로 MC:MeOH (1:1)의 조건으로 재 분리하였다. 이후 EtOH/EA 용매에서 재결정하여 순수한 화합물(MC1-2, MC2, MC 5-1)을 얻었다. EtOAc 가용분획물을 silica gel chromatography (EA:MeOH=1:1), sephadex LH-20 (MC:MeOH=1:1)의 조건으로 분리 후 EtOH/EA조건으로 재결정하여 순수한 화합물 EA-B를 얻었다. 화합물들의 구조를 확인하기 위해 ¹HNMR, ¹³CNMR, LC-Mass, IR 등의 기기분석을 실시하여 구조를 동정하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 독성 측정은 Carmichael 등[3]의 방법에 따라 측정하였다. HS68 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cells/well이 되게 180 μl 분주하고, 시료를 농도 별로 조제하여 20 μl 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하였다. 여기에 5 mg/ml 농도로 제조한 MTT 용액 20 μl를 첨가하여 3시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Procollagen type- I 생합성 kit 측정

세포를 1×10⁴ cells/well 농도로 96well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이렇게 실험한 세포의 배양액을 모아 실험에 사용하였다. 세포 배양액 내 collagen 생합성 정도는 procollagen type- I C peptide(PIP) EIA kit (Takara Bio, Japan)을 사용하여 propeptide의 양을 측정하였다.

MMP-1 저해활성 kit 측정

세포를 1×10⁴ cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이때 MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF-α를 10 ng/ml의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 Gross B.E. 등[10]의 방법에 따라 matrix metalloproteinase-1 biotrack activity assay kit을 이용하여 측정하였다.

통계처리

결과 통계처리는 SPSS 10.0 (Evanston, IL, USA)을 사용하

였으며, 유의차 검증은 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 한 후 α=0.05 수준에서 Tukey's HSD test에 의해 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

활성물질 분리 결과

우방자로부터 주름개선 물질을 개발하기 위해 분리, 정제하여 4개의 물질을 분획 하였다(Fig. 2). 그 중 화합물 MC-5-1은 major 성분으로 백색의 분말을 얻었으며, 우선 습식법으로 flavonoid 검출시약인 FeCl₃과 반응성을 확인한 결과, 특별한 반응을 하지 않는 것으로 보아 flavonoid류가 아님을 확인 하였다. 또한 UV spectrometer를 측정한 결과 280 nm 근처에서 특정 peak의 흡수가 있는 것으로 보아 aromatic ring을 갖고 있는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 ¹HNMR 측정결과 OCH₃기의 proton signal (δ 3, 79, 3.75)이 single로 보였으며, glucose와 관련된 proton peak를 확인 할 수 있었다. ¹³CNMR에서 carbonyl group의 181.23을 확인 할 수 있었다. 또한 aromatic ring에 관련된 proton들이 서로 coupling하고 있는 것도 확인 하였다. 또한 3.71-3.68(m), 3.49-3.46(m)이 ¹H 로 chiral carbon임을 확인 할 수 있었다. 마지막으로 LC mass를 통해 분자량을 측정결과 [534+Na]이 붙어 있는 557.44임을 확인하였다. 기존에 발표된 data[26]와 비교 하였을 때 문헌 치와 일치하였고, 표준품과 HPLC data를 직접 비교하여 화합물 MC 5-1은 arctiin으로 동정하였다.

화합물 MC 1-2는 무결정의 백색의 분말로 FeCl₃과 반응성을 확인한 결과 반응하지 않아 flavonoid 화합물이 아님을 확인하였다. 280 nm부근에서 강한 UV 흡수 spectrum를 나타내는 것으로 보아 전형적인 페놀화합물임을 알 수 있었다. IR 측정결과 3,400 cm⁻¹부근에서 특성흡수를 나타내는 것으로 보아 hydroxy group을 갖고 있는 것을 확인 하였으며 이와 같은 결과로 alkyl group임을 알 수 있었다. 또한 ¹H, ¹³CNMR에서 보여 지는 peak의 MC 5-1화합물(arctiin)과 glucose group를 제외하고 나머지는 spectrum은 모두 유사한 것을 확인 할 수 있었다. LC mass 측정결과 [M+]⁺ 373임을 확인하였고 기존에 발표된 data [16]와 비교하였을 때 문헌 치와 일치하였다. 표준 품과 HPLC data를 직접 비교하여 화합물 MC 1-2은 arctigenin으로 동정하였다.

화합물 MC2는 무결정의 백색 분말로 FeCl₃과 반응성을 확인한 결과 반응하지 않아 flavonoid 화합물이 아님을 확인하였다. 또한 280 nm 부근에서 강한 UV 흡수 spectrum을 나타내는 것으로 보아 전형적인 페놀화합물임을 알 수 있었다. IR 측정결과 3400cm⁻¹부근에서 특성흡수를 나타내는 것으로 보아 hydroxy group를 갖고 있는 것을 확인하였다. 또한 ¹H, ¹³CNMR NMR spectra은 화합물 MC 1-2와 비교하였을 때 OCH₃기의 proton signal (3.73)과 그들의 carbon peak들

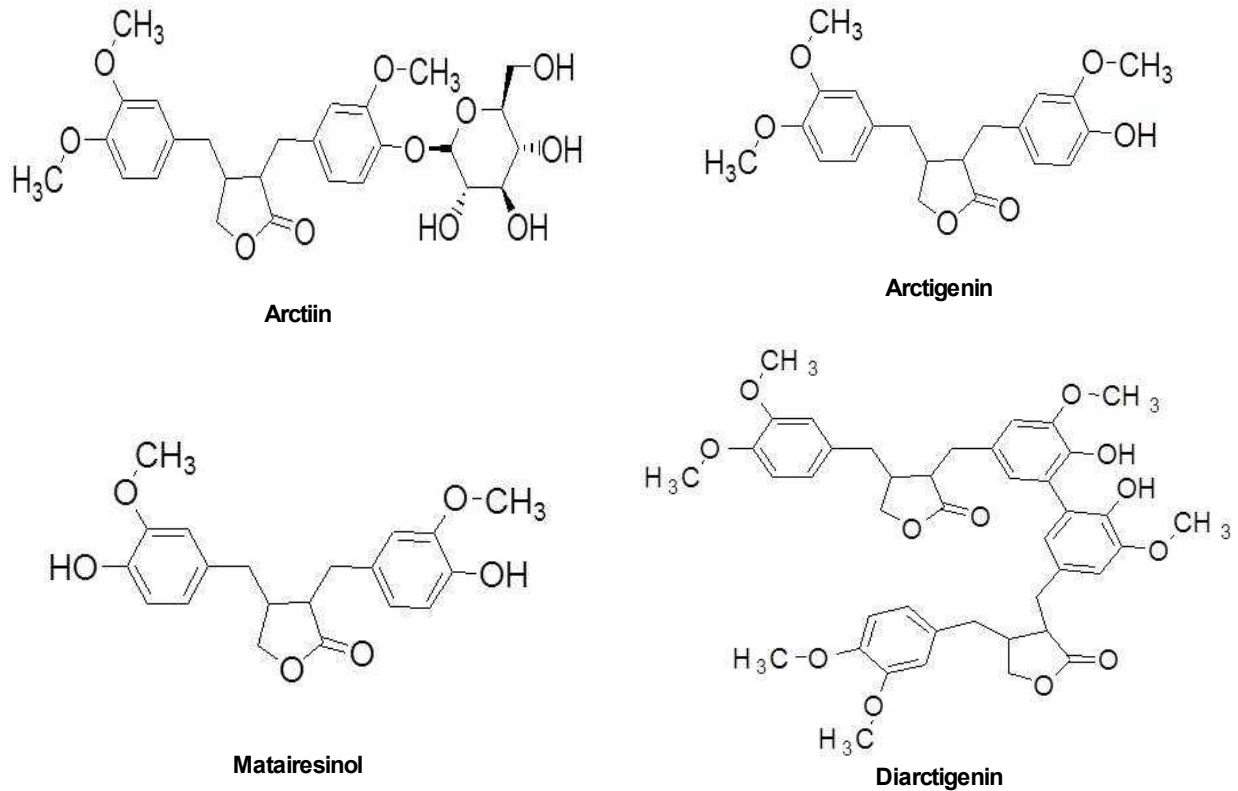


Fig. 2. The Structure of isolated compounds from *Arctium lappa* seed.

Compound MC 5-1 (Arctiin)

$^1\text{H NMR}$ (CD₃OD, 400MHz) δ 7.05(d, J=8.0 Hz), 6.82(d, J=8.8Hz), 6.75(d, J=1.6 Hz), 6.65(dd, J=2.0, 8.4 Hz), 6.61(d, J=2.03-2.67(dd, =1.6 Hz), 6.59(d, J=1.6 Hz), 4.86(d, J=4.0), 4.18(dd, J=4.0, J=4.8Hz), 4.69(q, J=14.0), 3.84(d, J=0.8), 3.79(s), 3.75(s), 3.71-3.68(m), 3.49-3.46(m), 3.41-3.39(m), 3.35-3.31(m), 3.30-2.85(m), 2.83-2.67(dd, J=1.0, 5.2 Hz), 2.57-2.55(m), $^{13}\text{C NMR}$ (CD₃OD, 100mHz) δ 181.23, 149.49, 149.31, 145.69, 133.08, 131.56, 121.81, 120.92, 116.70, 113.64, 112.45, 111.91, 76.99, 76.66, 73.74, 71.73, 70.16, 61.34, 55.53, 55.34, 46.40, 41.32, 37.72, 34.23

Compound MC 1-2 (Arctigenin)

$^1\text{H NMR}$ (CD₃OD, 400MHz) δ 6.80(d, J=8.8Hz), 6.70(dd, J=8.0, 2.0Hz), 6.62(dd, J=8.0, 2.0Hz), 6.60(dd, J=8.0, 2.0Hz), 6.74(d, J=2.0Hz), 6.84(d, J=8.0Hz), 4.09(dd, J=8.8, 7.5Hz), 3.87(dd, J=8.3, 7.5Hz), 3.73(s), 3.71(s), 3.70(s), 2.82(dd, J=14.0, 5.5Hz), 2.74(dd, J=14.0, 7.0Hz), 2.47(m), $^{13}\text{C NMR}$ (CD₃OD, 100mHz) δ 131.27, 111.82, 148.68, 147.33, 113.43, 120.38, 36.92, 40.84, 70.71, 128.91, 112.37, 147.44, 145.14, 115.31, 121.59, 33.75, 45.68, 178.48, 55.54, 55.45, 55.34

Compound MC 2 (Matairesinol)

$^1\text{H NMR}$ (CD₃OD, 400MHz) δ 6.80(d, J=8.8Hz), 6.70(dd, J=8.0, 2.0Hz), 6.62(dd, J=8.0, 2.0Hz), 6.60(dd, J=8.0, 2.0 Hz), 6.74(d, J=2.0Hz), 6.84(d, J=8.0Hz), 4.09(dd, J=8.8, 7.5Hz), 3.87(dd, J=8.3, 7.5Hz), 3.71(s), 3.70(s), 2.82(dd, J=14.0, 5.5Hz), 2.74(dd, J=14.0, 7.0Hz), 2.47(m), $^{13}\text{C NMR}$ (CD₃OD, 100mHz) δ 131.27, 111.82, 148.68, 147.33, 113.43, 120.38, 36.92, 40.84, 70.71, 128.91, 112.37, 147.44, 145.14, 115.31, 121.59, 33.75, 45.68, 178.48, 55.45, 55.34

Compound EA 5 (Diarctigenin)

$^1\text{H NMR}$ (CD₃OD, 400MHz) δ 6.80(d, J=8.8Hz), 6.62(dd, J=8.0, 2.0Hz), 6.60(dd, J=8.0, 2.0Hz), 6.74(d, J=2.0Hz), 6.84(d, J=8.0Hz), 4.09(dd, J=8.8, 7.5Hz), 3.87(dd, J=8.3, 7.5Hz), 3.73(s), 3.71(s), 3.70(s), 2.82(dd, J=14.0, 5.5Hz), 2.74(dd, J=14.0, 7.0Hz), 2.47(m), $^{13}\text{C NMR}$ (CD₃OD, 100mHz) δ 131.27, 111.82, 148.68, 147.33, 113.43, 120.38, 36.92, 40.84, 70.71, 128.91, 112.37, 147.44, 145.14, 121.59, 33.75, 45.68, 178.48, 55.54, 55.45, 55.34

(55.54)을 제외하고 나머지 peak는 동일한 것을 확인하였다. 따라서 본 화합물은 arctigenin과 유사한 lignan 화합물인 matairesinol 화합물로 동정 할 수 있었으며 표준품과 HPLC data를 직접 비교하여 재확인하였다.

화합물 EA-B는 EA 분획에서 분리한 화합물로 무결정의 백색의 물질을 얻었으며 기기분석 값들이 화합물 MC 1-2, 2, 5-1

과 매우 비슷한 경향을 보였다. 특히 arctigenin과 매우 유사한 형태의 spectra를 갖는 것을 확인 하였다. 하지만 $^1\text{H NMR}$ 측정결과 aromatic ring에 붙어 있는 coupling 값이 변화한 것을 확인 하였고, LC-mass 측정 결과 분자량이 [M+]⁺ 값인 742임을 확인 하였고, 기존에 발표된 data[8]와 비교 하였을 때 문헌치와 일치하여 화합물 EA-B는 diarctigenin으로 동정하였다.

MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

우방자에서 분리한 4가지 lignan 화합물이 human dermal fibroblast HS68 세포의 증식에 미치는 영향을 알아본 결과는 Fig. 3과 같다. Lignan 화합물을 50 μM에서 시험한 결과 생물학적 유의차가 없는 것을 확인하여, 이와 같은 농도에서 실험을 진행하였다.

Procollagen type I 생합성 kit 측정

진피층은 90%가 collagen으로 구성되어 있어 collagen의 감소는 피부노화와 밀접한 관계를 가지고 있다. 탄력섬유인 collagen은 망상구조로 존재하며 털을 세워주는 기모근과 함께 진피를 지지하고 있으며 지금까지 19가지 아형이 알려져 있고, 1500개의 아미노산으로 구성된 α-chain을 가지는 동종 또는 이종 삼중나선 구조를 형성한다[14]. 특히 진피 중에는 collagen type I, III, IV, V가 가장 많고, type V는 type I과 III은 hybrid 형태로 존재하며 이들은 procollagen이라는 전구물질의 형태로 합성된다. procollagen은 아미노 말단과 카복시 말단에 propeptide라는 peptide 염기서열을 포함한다. propeptide는 소포체내에서 procollagen 분자의 folding을 도와줌과 동시에 collagen 중합반응이 일어날 때 collagen 분자로부터 절단, 분리된다고 알려져 있다. 그래서 propeptide의 양을 측정함으로써, 세포 내에서의 collagen 생합성 정도를 파악할 수 있다[25]. 주름개선 활성을 나타낸 우방자의 70% EtOH추출물을 유기용매별로 순차 추출하여 활성을 관찰하였을 때, methylene chloride 층이 대조군에 비해 collagen 생합성량이 증가하였다. Table 1과 같은 결과를 바탕으로 각종 column chromatography를 이용한 activity-guided isolation을 수행하였다. 우방자 추출물로부터 분리된 4종의 화합물을 처

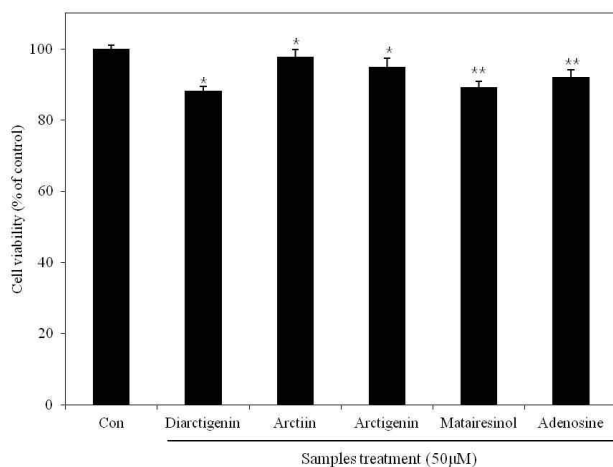


Fig. 3. Cell viability of HS68 fibroblast cells after treatment with compounds from *Arctium lappa* L. seed. Control cell were incubated with vehicle alone. The data represent the mean±SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

리하여 배양했을 때 collagen 생합성량을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 실험 결과 arctiin > diartigenin > arctigenin > matairesinol 순으로 collagen 생합성이 증가하는 것을 확인하였다. 4가지 lignan 계열의 화합물들 중 arctiin의 경우 50 μM의 농도에서 시료를 처리하지 않는 군에 비해 약 29% 정도 유의하게 증가한 것을 확인하여 효과가 가장 뛰어난 것으로 나타났다. Collagen 합성은 activator protein-1(AP-1)과 nuclear factor κB(NF-κB)의 활성화에 의해 저해되고, 이와 함께 염증반응의 증가로 인해 피부를 구성하는 지질, 단백질, 핵산, 효소 등이 손상되어 노화가 일어나는 것으로 collagen 합성과 염증반응은 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다[15]. Lee 등[19]의 연구결과에 의하면 arctiin은 NF-κB 경로에 영향을 미쳐 COX-2 발현을 억제 시킨다는 보고한 바 있는데, 위의 결과를 보아 arctiin의 콜라겐 생합성은 항염증 작용에 의해 NF-κB의 활성화를 억제시켜 증가한 것으로 사료된다.

MMP-1 저해활성 kit 측정

체내에서 생성되는 수종의 MMPs 가운데 MMP-1은 collagen에 특이적으로 작용하는 protease로서 MMP-1의 활성을 억제하여 collagen의 분해를 감소시키면, 피부조직의 탄력을 유지하고 주름생성을 예방할 수 있는 것으로 알려져 있다 [23,28]. MMP-1 저해활성 또한 procollagen 생합성 측정과 같이 methylene chloride 층이 MMP-1 저해활성이 가장 우수하였고, 이를 chromatography를 통해 activity-guided isolation을 수행하였다. 우방자로부터 분리된 4종의 화합물을 처리하였을 때 MMP-1의 농도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. TNF-α를 처리하지 않은 군과 처리한 군은 각각 68.7 ng/ml, 107.1 ng/ml의 MMP-1을 생산하여 TNF-α를 처리함으로써 MMP-1

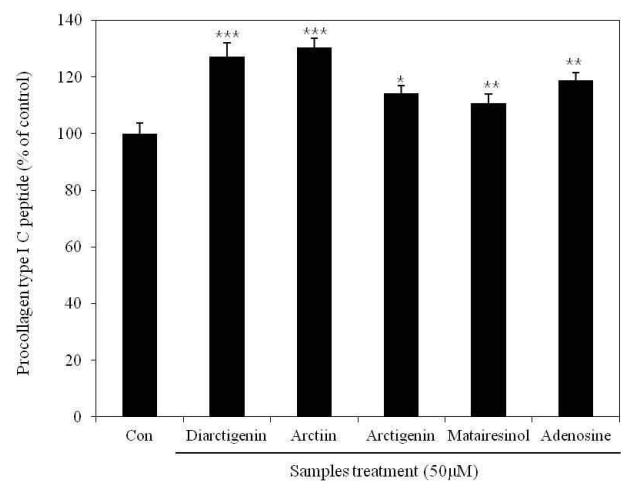


Fig. 4. Procollagen synthesis of human dermal fibroblast treated with compounds from *Arctium lappa* L. seed. Control cell were incubated with vehicle alone. The data represent the mean±SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

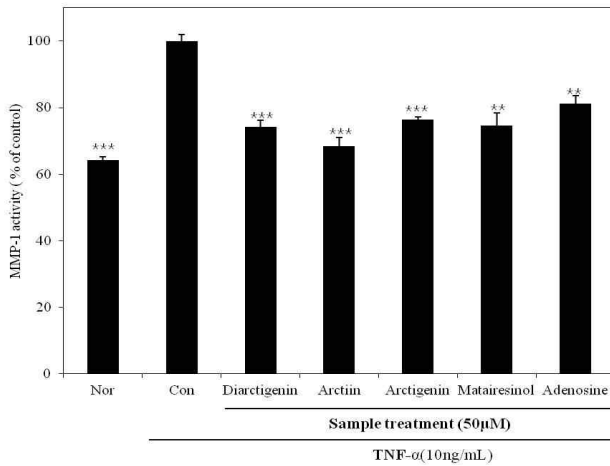


Fig. 5. Inhibitory effect of compounds from *Arctium lappa* L. seed the expression of MMP-1 in the UVB irradiated human dermal fibroblasts. Control cell were incubated with vehicle alone. The data represent the mean±SD of three separate experiments (Significant as compared to control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

양이 활성화 됨을 확인 할 수 있었다. Arctiin > diartigenin > matairesinol > arctigenin 순으로 MMP-1 활성을 저해시키는 것을 확인하였다. 우방자 정제물 4종 모두 MMP-1 생산을 농도 의존적으로 저해하였으며, 특히 arctiin의 경우 시료를 처리하지 않은 군과 비교시 50 μM의 농도에서 약 23.2% 정도 MMP-1 생성을 저해하여 4종의 화합물 중 가장 우수하였다. 최근 arctiin은 항염증 효과 외에는 주름개선과 관련된 보고는 없었으므로 본 연구 결과를 통해 arctiin을 활용하여 주름개선 소재로 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

References

- Awale, S., Lu, J., Kalauni, S. K., Kurashima, Y., Tezuka, Y., Kadota, S. and Esumi, H. 2006. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res* **66**, 1751-1757.
- Bailly, C., Drèze, S., Asselineau, D., Nusgens, B., Lapière, C. M. and Darmon, M. 1990. Retinoic acid inhibits the production of collagenase by human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **94**, 47-51.
- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**, 936-942.
- Saliou, C., Kitazawa, M., McLaughlin, L., Yang, J. P., Lodge, J. K., Tetsuka, T., Iwasaki, K., Cillard, J., Okamoto, T. and Packer, L. 1999. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radic. Biol. Med* **26**, 174-183.
- Cho, M. K., Jang, Y. P., Kim, Y. C. and Kim, S. G. 2004. Arctigenin, a phenylpropanoid benzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF-alpha inhibition. *Int. Immunopharmacol.* **4**, 1419-1429.
- Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J., Lin, P., McPhillips, F., Wang, Z., Li, X., Wan, Y., Kang, S. and Voorhees, J. J. 1998. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **101**, 1432-1440.
- Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J. and Voorhees, J. J. 1999. Molecular mechanism of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol.* **69**, 154-157.
- Geerts, A., Schuppan, D., Lazeroms, S., De Zanger, R. and Wisse, E. 1990. Collagen type 1 and 3 occur together in hybrid in the space of disse the rat liver. *Hepatology* **12**, 233-241.
- Gilchrest, B. A. 1990. Skin aging and photoaging. *Dermatol. Nurs.* **2**, 79-82.
- Gross, J. and Lapiere, C. M. 1962. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **54**, 1197-1204.
- Ha, T. Y. 2006. Development of functional food materials for healthy life. *Kor. J. Crop. Sci.* **51**, 26-39.
- Huang, C., Ma, W. Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A. and Dong, Z. 1997. Blocking activator protein-1 activity, but not activation retinoic acid response element, is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 5826-5830.
- Jung, H. S., Ha, J. H., Kim, Y. K., Oh, S. H., Kim, S. S., Jeong, M. H. and Lee, H. Y. 2009. Effect of *Rubus coreanus* extracts on ultraviolet-A irradiated cultured human skin fibroblasts. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* **17**, 321-327.
- Kang, K. S., Kim, I. D., Kwon, R. H., Heo, Y. Y., Oh, S. H., Kim, M. A. Jung, H. J. Kang, H. Y. and Ha, B. J. 2007. The evaluation of anti-wrinkle effects in oriental herb extract. *J. Life. Sci.* **17**, 1147-1151.
- Kang, S., Cho, S., Chung, J. H., Hammerberg, C., Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. 2005. Inflammation and extracellular matrix degradation mediated by activated transcription factors nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in inflammatory acne lesions *in vivo*. *Am. J. Pathol.* **166**, 1691-1699.
- Kim, B. H., Hong, S. S., Kwon, S. W. Lee, H. Y., Sung, H., Lee, I. J., Hwang, B. Y., Song, S. Lee, C. K., Chung, D., Ahn, B., Nam, S. Y., Han, S. B. and Kim, Y. 2008. Diarctigenin, a lignan constituent from *Arctium lappa*, down-regulated zymosan-induced transcription of inflammatory genes through suppression of DNA binding ability of nuclear factor-kappaB in macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 393-401.
- Kim, E. K., Li, G. Z., Chai, O. H. and Song, C. H. 2004. Inhibitory effect of *Arctium lappa* linne on compound 48/80 induced mast cell activation and vascular permeability. *Kor. J. Phys. Anthropol.* **17**, 55-66.
- Lee, B. C., Lee, J. J., Park, S. M., Kim, C. B., Sim, G. S.,

- Kim, J. H., Lee, G. S., Lee, C. I. and Pho, H. B. 2004. 3,9-Diferuloyl-6-oxoptero-carpen(Tensolin-F): a novel anti-wrinkle agent for cosmeceuticals. *J. Soc. Cosmet. Sci. Kor.* **30**, 7-13.
19. Lee, S. W., Shin, S. M., Kim, H. Y., Han, S. H., Kim, K. H. and Kwon, J. H. 2011. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF-B pathways. *J. Inflammation* **8**, 16.
20. Lin, S. C., Chung, T. C., Lin, C. C., Ueng, T. H., Lin, Y. H. Lin, S. Y. and Wang, L. Y. 2000. Hepatoprotective effects of *Arctium lappa* on carbon tetrachloride and acetaminophen induced liver damage. *Am J. Chin. Med.* **28**, 163-173.
21. Matsumoto, T., Hosono-Nishiyama, K. and Tamada, H. 2006. Antiproliferative and apoptotic effects of butyrolactone lignans from *Arctium lappa* on leukemic cells. *Planta Med.* **7**, 276-278.
22. Morita, K., Kada, T. and Namiki, M. 1984. A desmutagenic factor isolated from burdock (*Arctium lappa* Linne). *Mutat. Res.* **129**, 25-31.
23. Nagase, H. and Woessner, J. F. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
24. Nam, J. Y., Kim, D. G. and Lee, J. Y. 2006. Effects of woobangja on anti-allergic inflammation. *J. Kor. Ori. Med.* **20**, 241-255.
25. Parfitt, A. M., Simon, L. S., Villanueva, A. R. and Krane, S. M. 1987. Procollagen type I carboxy-terminal extension peptide in serum as a marker of collagen biosynthesis in bone. correlation with iliac bone formation rates and comparison with total alkaline phosphatase. *J. Bone Miner. Res.* **2**, 427-436.
26. Park, S. Y., Hong, S. S., Han, X. H., Hwang, J. S., Lee, D. J., Ro, S. and Hwang, B. Y. 2007. Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **55**, 150-152.
27. Sim, G. S., Kim, J. H., Lee, D. H., Park, S. M., Pho, H. B., Zhang, Y. H. and Lee, B. C. 2005. Effects of the *Spatholobi caulis* extract on antioxidation and inhibition of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **20**, 40-45.
28. Talwar, H. S., Griffiths, C. E., Fisher, G. J., Hamilton, T. A. and Voorhees, J. J. 1995. Reduced type I type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 285-290.
29. Voegeli, R. 1996. Elastase and typtase determination on human skin surface. *Cosmetic Toiletries* **111**, 51-58.

초록 : 우방자에서 분리한 주름개선 화합물

황주영¹ · 박태순¹ · 김동희¹ · 황은영¹ · 이정노² · 이지영² · 이강태² · 이건국² · 손준호^{1*}
 (¹한국한방산업진흥원, ²코리아나화장품)

본 연구에서는 우방자를 70% 에탄올로 추출하여 얻어진 추출물을 n-hexane, methylene chloride, ethyl acetate 로 순차용매 분획하였다. 각 분획물에 대해 activity-guided isolation을 수행하여 활성물질의 분리 정제를 실시하였다. 활성을 나타내는 물질은 silica gel chromatography (230 mesh), sephadex LH 20, recrystallization method 를 이용하여 분리하였다. 각 화합물의 화학구조는 NMR 스펙트럼 데이터 해석하였고 arctiin, arctigenin, di-arctigenin, matairesinol 으로 동정하였다. 이들을 human dermal fibroblast HS68 세포에 처리하여 얻어진 상등액은 ELISA kit를 활용하여 procollagen type I 생합성과 MMP-1 저해활성을 측정하였다. 측정결과 procollagen type I 생합성과 MMP-1 저해활성 결과 모두 arctiin이 가장 우수한 결과를 보였다. 이와 같은 결과를 통해 우방자에서 분리한 리그난 화합물들을 이용하여 주름개선 소재로 개발할 수 있을 것으로 사료 된다.